

有機溶媒を含む系におけるセリンカルボキシペプチダーゼによる反応

功 刀 滋* 近藤俊弘* 野村哲士*

Serine Carboxypeptidase Reactions in Systems
Containing Organic Solvents

Shigeru KUNUGI, Toshihiro KONDOH and Akihiko NOMURA

(Received Feb. 28, 1989)

Reactions of serine carboxypeptidases (carboxypeptidases containing serine residue at the reactive site; one from yeast (CPase Y) and another from wheat (CPase W)) were investigated in systems containing organic solvents. First the esterase activity of these enzymes in aqueous organic systems was studied and both k_{cat} and K_m parameters were found to increase with increasing organic solvent content. Based on these results peptide formation reactions from ester and amino acid amides were studied for either aqueous organic system or micro-two-phase system including organic solvents practically insoluble to water.

1. はじめに

酵素に代表される生体触媒を用いて有機化合物を合成することは、既存の発酵工業の範囲をこえた領域においてまでも興味が持たれている。酵素触媒の特長としては、その高い特異性や選択性などが挙げられるが、他面の特長としては穏和な条件下でいわば省エネルギー的に反応が進行するという点がある。ところが一般の化学工業の領域に属するような物質にまでこの自然の生んだ高機能な触媒を適用しようとするとき、「穏和な条件下」という特長はむしろ欠点となる場合がある。つまり、高温や強アルカリといった極端な条件下では酵素はほとんど働かない場合が多い。このため酵素という分子レベルでの触媒機能についてだけでなく、生物個体レベルでも極端な条件下で生きていける、または働くことのできるものを探しだす努力が重ねられている。

酵素分子のレベルで考えれば、このことは高分子化合物の安定性に帰着し、高温や強アルカリ性でいかに酵素タンパク質が安定に存在し機能し得るかということになる。このレベルでは、遺伝子工学における今日の技術を使ってある所定の環境に耐えることのできる新しい物質を創造するといった研究がはじめられている。¹⁾ 他方、このような研究に結びつくものとして、既存（天然）の酵素タンパク質が極端な条件下において、どのような挙動を示すかについての基本的検討が必要である。

酵素の固定化や化学修飾といった方法により、反応媒体として水のかわりにほとんどを有機溶媒に換えても活性を有することが示され興味をもたれている。²⁻⁶⁾ これらの研究は 疎水的環境下における生化学反応のモデルとして興味深いだけでなく、酵素の新しい性質を見いだす可能性や、バイオリアクターなどとして種々の用途に適用できるなどさまざまな可能性が考えられる。

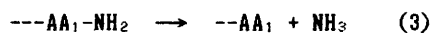
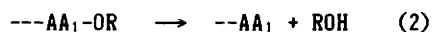
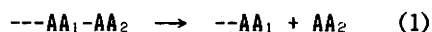
その応用のひとつとして、このような環境下において酵素によるペプチド縮合反応を試みる場合、次のような利点が考えられる。

- ・ 水に不溶の基質の場合でも、有機溶媒では溶解可能である。
- ・ 合成反応の平衡は水溶液中よりも有機溶媒中のほうが縮合方向に偏る。
- ・ 一度合成した生成物を、酵素の本来の活性により加水分解してしまうといった副反応が起こりにくい。
- ・ 水溶液中に比べ生成物の回収が容易でコストがかからない。

このような背景により、本研究では極端な条件の中でも有機溶媒中という因子に着目し、酵素の特性の変化や挙動などについて検討するとともに、その利用について研究した結果を報告する。

有機溶媒中での酵素の挙動は、古くから多くの研究の対象となってきたものであるが、⁷⁻⁹⁾ 近年に至って再び活発な研究が、とりわけ分子、原子レベルまで明らかにされつつある酵素タンパク質の構造及びその反応の機構に関する知見の蓄積の上に立って行われている。

酵素としては酵母由来のカルボキシペプチダーゼ Y（以下 CPase Y）¹⁰⁾ および小麦由来のカルボキシペプチダーゼ W（以下 CPase W）¹¹⁾ を取り上げた。これらの酵素はカルボキシペプチダーゼに分類される酵素であり、活性中心にセリン残基を有することからセリンカルボキシペプチダーゼとして金属を含む同類酵素と区別される。また、Pro をふくめたすべてのアミノ酸を遊離する広い特異性を持っていることでも知られている。¹²⁾ さらに、パラクロロ水銀安息香酸やフェニル水銀といった水銀誘導体などの SH 阻害剤の影響を比較的強く受け、さらに、本来の活性であるカルボキシペプチダーゼ活性（1）以外にエステラーゼ活性（2）やアミダーゼ活性（3）を有していることも特色とされている。



（AA_i：アミノ酸残基、R：アルキル基）

これらの活性のうちカルボキシペプチダーゼ活性は酸性側に、エステラーゼ活性、アミダーゼ活

性はアルカリ側に触媒活性の至適pH領域があることが知られており、また活性中心にセリン残基を有することから金属(Zn)系のカルボキシペプチダーゼAとは異なり、アミノリシス反応にるペプチド合成に利用できることが知られている。¹³⁻¹⁵⁾

本報告ではまず、これら両酵素のエステラーゼ活性について、基質としてアシルアミノ酸エステルを用い、1,4-dioxane, acetonitrile, dimethyl sulfoxide, N,N-dimethylformamideなどの水と混じり合う有機溶媒の与える影響について検討し、その結果を踏まえ、これら両酵素によるアシルアミノ酸エステルとアミノ酸アミドからのジペプチドの合成反応に対する、水と混じり合う有機溶媒の影響について検討した。ここでは便宜上、有機溶媒をこれらの水とよく混じり合うものと、benzene, toluene などの水とあまり混じり合わないものに分けて考える。後者の中でも ethyl acetate (酢酸エチル) (水中への溶解度10%程度)、や trichloromethane (クロロホルム; 同0.5% 程度) 等かなり水に溶解するものもあるが、任意の組成比で溶解しないものを「混じり合わない」として分類した。

さらに酵素が溶媒中に溶けださないことを利用し、CPase Y を単に固定化担体へ物理的吸着させた“固定化”酵素を調製し、¹⁶⁾ 反応系のほとんどを水と混じり合わない有機溶媒とするマイクロ二相系においてペプチド合成を行い、合成反応に対する酵素の特性の変化や、生成物の収率の影響などについて検討を行った。

2. 実験

2. 1. 試薬

CPase Y はオリエンタル酵母㈱より恵与されたものを使用した (Lot.No.21003601)。CPase W はベンテル㈱より購入したものを使用した (Lot.No.7231606)。N-[3-(2-Furyl)acryloyl]-L-phenylalanine ethyl ester (Fua-Phe-OEt) は福田らにより合成されたものを使用した。^{17,18)} L-glycinamide hydrochloride (Gly-NH₂·HCl) は東京化成工業㈱より、L-phenylalanine (Phe-NH₂) はSIGMA社よりそれぞれ購入した。

緩衝剤のN-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (Hepes) はナカライテスク㈱より、N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropanesulfonic acid (Taps) は同仁化学研究所㈱より、Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) は和光純薬工業㈱より、N,N-dimethylformamide (DMF), acetonitrile (MeCN), 1,4-dioxane, dimethyl sulfoxide (DMSO) ethyl acetate (酢酸エチル), trichloromethane (クロロホルム), benzene は和光純薬工業㈱、または関東化学㈱より購入した特級品か液体クロマトグラフ用製品を使用した。モレキュラシーブ (Wako 3A 1 /15) は和光純薬㈱より購入した。その他の試薬は市販の特級品またクロマトグラフ用製品を使用した。

2. 2. 酵素溶液の調製と濃度の測定

酵素を数mg秤量し、1mlの蒸留水に溶解し母液とする。母液の酵素濃度は、CPase Y については吸光度 $A_{1\%, 1\text{cm}, 280\text{nm}} = 15.0$ 、M.W.=61,000、CPase Wについては $A_{1\%, 1\text{cm}, 280\text{nm}} = 19.6$ 、M.W.=118,000をもとに、280nm での吸光度から計算して求めた。母液は 4℃で保存し、計算より求めた値か

ら必要な濃度に希釈して使用した。

2. 3. 基質濃度の決定

発色基としてフリルアクリロイル基 (Fua-基) を結合させたアミノ酸基質は、305nm に吸収極大をもつことより、その吸光係数 $\epsilon = 25500 (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ をもとに計算した。また 305nm において吸光度計で測定範囲をこえる濃度 (およそ $7 \times 10^{-5} \text{mol/l}$ 以上) では、あらかじめ 305nm で基質濃度が測定可能な範囲で濃度を求め、その濃度に対する 340nm での酵素による基質の加水分解前と分解後の吸光度の差から決定した。

2. 4. CPase Y, W のエステラーゼ活性の測定

反応液は適当量の NaOH 溶液で pH を 8.0 に調整した 0.1M Hepes 溶液に、基質 Fua-Phe-OEt を溶解させた水と混じりあう有機溶媒 (MeCN, dioxane, DMF または, DMSO) が、目的の含量 (2~20%) となるように加えて調製する。その溶液 2ml を石英セルにとり、酵素溶液 20 μl を加えて反応させ 340nm における吸光度の時間変化を恒温循環水槽 (ヤマト科学製 BF-41) を取り付けた紫外可視分光光度計 (日本分光科学製 UVIDEC-610B) により、25°C で測定し反応の初期速度を求めた。

2. 5. 反応速度の解析

(a) CPase Y については基質濃度を変化させて初期速度 (V_i) をとる初期速度勾配法を用いた。

$$v_i = k_{\text{cat}} [E_i] \cdot [S_i] / ([S_i] + K_m) \dots \dots \dots (1)$$

(i : 初期値)

(1) 式を変形して縦軸に $v_i / [E_i]$, 横軸に $v_i / [E_i] / [S_i]$ の値を取り、グラフより k_{cat}, K_m を求めた。

(b) CPase W の場合は、生成物阻害が大きくこの阻害を無視できる条件、すなわち $[S_i] \ll K_m$ の条件での二次反応速度定数の測定のみを行った。この場合、反応は擬一次反応となり、片対数プロットの傾きから二次速度定数を得ることができるが、 k_{cat} と K_m を個別に求めることはできない。

2. 6. ジペプチドの合成

反応溶液を全量で 5ml とし Gly-NH₂·HCl は 0.1M、NaCl は 0.2M となるようにサンプル管に秤量する。そこへ 0.1M Hepes 緩衝液を 2~3ml 加え、さらに基質である Fua-Phe-OEt が反応系で 1mM となるように有機溶媒を所定の量加える。この段階で pH を 8.0 に調整した後、0.1M Hepes 緩衝液 (pH 8.0) を適量加え、4.9ml の基質溶液を調製する。この基質溶液に目的の濃度に調整した酵素溶液 100 μl を加えて反応を開始する。反応は振とう器付き恒温槽 (東京理化学機械 (株) 製, EI-10) 内において 30°C で行い、時間ごと反応系より 50 μl をサンプリングし 950 μl の MeCN に加え反応を停止させた。反応を停止させたサンプルは、Millipore filter (Type: HV, Pore Size: 0.45 μm) を通した後、HPLC (Shimadzu LC-6A, Cosmosil 5C18P reversed-phase column) により生成物を分離し、検出器 (Shimadzu SPD-6A) により 305nm で検出し、積分計 (Shimadzu C-R3A) により定量化した。

溶離液は、50mM トリエチルアミンを含むリン酸水溶液 (pH 3.0) と MeCN とを 5:5 の割合で混ぜた混合液を、脱気した後使用した。流速は通常 1.0ml/min とした。

2. 7. ガラスビーズへの酵素の“固定化”

酵素が水と混じりあわない溶媒に不溶であることを利用した“固定化”（物理的な固定化担体への吸着）は以下に行った。固定化担体としてはガラスビーズ（和光純薬工業製FPG-700S〔カラムクロマトグラフ用〕）を用いた。“固定化”（吸着）方法は目的のpHに調整した 0.1M Tris 緩衝液 300 μ l に CPase Y 0.25-1mg を溶解させた酵素溶液に、ガラスビーズ 100mg を浸し、ガラスビーズがさらさらと動く程度（デシケーター中でおよそ3hr）まで減圧乾燥させた。このように調製した“固定化” CPase Yは4 $^{\circ}$ Cで保存し、使用直前に、再び乾燥させて用いた。（Scheme 1）

2. 8. “固定化” CPase Yによる水と混じり合わない有機溶媒中での反応

あらかじめ蒸留水で十分に水飽和させた有機溶媒（benzene, 酢酸エチル, クロロホルム, toluene, hexane, trichloroethylene, n-butyl ether, 1,1,1-trichloroethane）で、1mM Fua-Phe-OEt, 10-100mM Phe-NH₂ の濃度となるように基質溶液を調製する。上で調製した“固定化” CPase Y を栓付試験管に20-50mgを量り取り、そこに前述の基質溶液300 μ lを加え、反応させる。反応は振とう器付恒温槽内において30 $^{\circ}$ Cで行った。単位時間ごとに反応系より30 μ lをサンプリングし、溶媒をアスピレーターで蒸発させた後、500 μ lのMeCNを加え溶解し、その後上記の方法により分析した。

実際には基質である Fua-Phe-OEtと求核剤として用いたPhe-NH₂ の有機溶媒に対する溶解性から benzene, 酢酸エチル, クロロホルム の三種類の有機溶媒でしか反応を行うことができなかった。

3. 結果と考察

3. 1. エステルの加水分解

Table 1 は CPase YのFua-Phe-OEt に対するエステラーゼ活性において水と混じり合う有機溶媒の反応系での含量が、K_m、k_{cat}、k_{cat}/K_m 値に及ぼす影響を示したものである。反応系での有機溶媒の含量は 2~20%の範囲で測定した。基質が水に不溶であるため有機溶媒含量が 0%の値は求めることができなかった。測定した範囲ではエステラーゼ活性のK_mの値はdioxane にもっとも影響を受けやすく、大きく増加している。ついでMeCN, DMF, DMSO の順にK_mの値が増加している。増加の傾向としては、dioxane, DMSOは緩やかなカーブを描いて増加し、MeCN, DMFは S字型のカーブを描いて増加する傾向が認められた。

有機溶媒の含量が20%までにおいてはk_{cat}の値はDMF, DMSOは増加傾向を示しており、dioxaneは10%付近にピークを示し、それ以上の含量では減少している。MeCNは15%付近にピークを持ち、15%以上では低下を見せた。

MeCNの系で5%までのMeCNの添加以外は、どの有機溶媒の系においても有機溶媒の含量が増加するに従い二次速度定数は低下し、その度合いはDMSO, DMF, MeCN, dioxane の順に大きくなっている。MeCNも5%以上の含量になるとdioxane と同程度の急激な低下が認められた。

一方、Fig. 1 はCPase WのFua-Phe-OEt に対するエステラーゼ活性において、水と混じり合う有機溶媒の反応系での含量が、二次速度定数k_{cat}/K_m に及ぼす影響を示したものである。基質が水に不溶であるので1%のMeCN含量を基準とし、そこに目的の有機溶媒を所定量加えたときの活性を測定した。したがって「0%」での値は MeCN 1%でのk_{cat}/K_m値を示している。いずれの有機溶媒

Table 1.

Kinetic Parameters of Esterase Activity of CPase Y in Aqueous Organic Solvents*

Solvent	content(v/v%)	kcat(s ⁻¹)	K _m (mM)	kcat/K _m (M ⁻¹ sec ⁻¹)
dioxane	2.0	123	0.11	1.13 x10 ⁶
	5.0	145	0.26	5.51 x10 ⁵
	10.0	171	0.82	2.06 x10 ⁵
	15.0	155	2.0	7.70 x10 ⁴
MeCN	2.0	89	0.11	7.95 x10 ⁵
	5.0	92	0.11	8.09 x10 ⁵
	10.0	92	0.34	2.64 x10 ⁵
	15.0	65	0.30	2.07 x10 ⁵
	20.0	58	1.1	4.81 x10 ⁴
DMF	2.0	121	0.058	2.03 x10 ⁶
	10.0	129	0.15	8.51 x10 ⁵
	15.0	154	0.49	3.12 x10 ⁵
	20.0	167	0.95	1.17 x10 ⁵
DMSO	2.0	102	0.050	1.73 x10 ⁶
	10.0	147	0.11	1.26 x10 ⁶
	20.0	169	0.37	4.46 x10 ⁵

* [E]=50~200nM, [Fua-Phe-OEt]=0.05 -1 mM, pH 8.0 (0.1 M Hepes), 25°C.

においても含量の増加に伴い活性が低下している。特にdioxane の場合、他の有機溶媒に比べかなり大きな活性の低下が認められた。他の三種の有機溶媒はkcat/K_m に対してかなりよく似た傾向を与えており、その影響の強さは MeCN, DMSO, DMFの順で大きくなっている。

CPase Y と CPase W の kcat/K_m に対する有機溶媒の影響を測定した範囲で比較した場合、全体的に CPase W が有機溶媒の影響を強く受けており活性低下が大きい。そして、両酵素ともdioxane に最も強い影響を受けているのがわかる。また、MeCNに対してはかなり違った傾向を示しており、CPase Yではdioxane と同程度のかかなり強い影響を受けているのに対し、CPase Wでは四種類の中では一番小さい影響であった。

CPase Yにおいて、K_m やkcatへの有機溶媒の影響は有機溶媒の違いによる差はあるものの、現象的には有機溶媒の含量の増加に伴うK_mの増大、および少量の有機溶媒でのkcatのわずかな増大など、セリンエンドプロテアーゼであるα-キモトリプシンと同様な傾向を示している。⁸⁾ pHが一定であれば活性発現に関与しているHis のイミダゾール残基のpKa は有機溶媒の含量にあまり依存しな

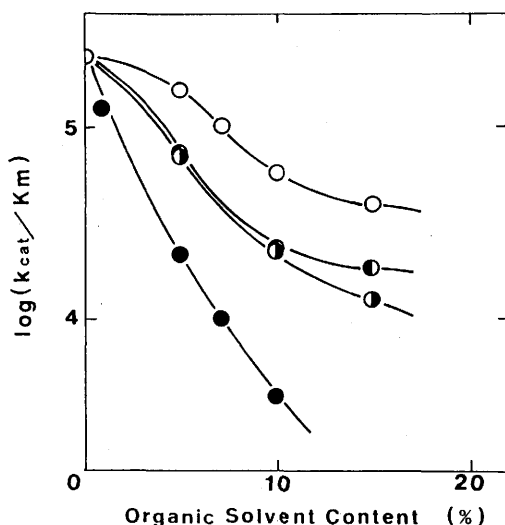


Fig. 1. Effect of organic cosolvent content on k_{cat}/K_m of the CPase W catalyzed hydrolysis of Fua-Phe-OEt.

○: MeCN, ●: dioxane, ◐: DMF, ◑: DMSO.

[Fua-Phe-OEt]=51 μ M, [E]=86 nM, 25°C, pH8.0(Hepes).

いと考えると、アシル化の速度は有機溶媒の含量に依存しないと考えられる。脱アシル化においては水分子を必要とするため、少なくとも水のモル分率の低下に伴って活性は低下することが予想できるが、ここで見られる k_{cat} の変化は全く異なっている。一方、有機溶媒の含量の増加に伴う K_m の増大は、基質に対して有機溶媒が拮抗阻害剤になることと、疎水性相互作用が低下することによると思われる。CPase Yは本来の基質であるペプチドの取り込みにおいては、主として基質C末端のカルボキシレートアニオンと基質上の（おそらく HisH⁺）カチオンとのイオン間力を利用しているが、ここで用いたようなエステル基質の取り込みでは疎水性相互作用を主としていることが圧力依存性の解析などから知られている。前者の相互作用は低誘電率性の溶媒の共存により強化されるが疎水性相互作用では、水の構造破壊から低下がもたらされるものと考えられる。溶媒分子そのものが基質結合部位に取り込まれ基質の結合を妨害することは、溶媒分子1個の相互作用力はあまり大きくなくてもその高い濃度（10³M オーダー）を考慮することにより理解できよう。とくに、dioxaneの阻害作用は強いことが α -キモトリプシンの結果などでも報告されているが、⁸⁾ここでの結果もそれを示している。もちろん有機溶媒による酵素タンパク質そのものの変性も速度定数に影響を与えられ、いずれの場合も有機溶媒の違いがかなり反映されることは容易に理解できる。

CPase Wについては k_{cat}/K_m に対する有機溶媒の影響しか調べていないが、基本的にはCPase Yと同様な影響を受けていると思われる。ただ MeCN の影響が両酵素においてかなり傾向が違うのは k_{cat}/K_m の値がほぼ K_m の値に左右されていることから、活性部位での阻害作用が違うためと考えられる。また、CPase Wがダイマー酵素であることなどもその要因の一つであると思われる。

3. 2. 水と混じり合う溶媒系におけるペプチド合成

Table 2はCPase Yのエステラーゼ活性における k_{cat}/K_m に対する有機溶媒の効果を調べたTable 1を内そうした曲線において、dioxane の5 %含量での活性値を基準として、同様の加水分解活性値を示す他の有機溶媒の含量において合成反応を行ったものである。表中で表される Dの値は誘電率であり、RPM は経験的な相対極性指標（数字の大きい方が極性が大きい）¹⁹⁾ である。加水分解活性が同じ値であっても、合成収率はまったく違い、誘電率やRPMでは簡単に説明できない。

Table 2.

CPase Y Catalyzed Peptide Synthesis in Aqueous Organic Solvents*

solvent	solvent content (%)	product (%)		D (25°C)	RPM
		Fua-Phe-Gly-NH ₂	Fua-Phe		
dioxane	5.0	64.1	35.9	2.2	36.0
MeCN	7.0	81.4	18.6	36.2	46.0
DMF	13.0	35.4	64.6	36.7	43.8
DMSO	18.0	26.3	73.7	46.7	45.0

* [E] = 4nM, [Fua-Phe-OEt] = 1mM, [Gly-NH₂] = 0.1M, 0.2 M NaCl, pH 8.0 (0.1 M Hepes), 3 h, 30 °C.

Table 3.

CPase W Catalyzed Peptide Synthesis in Aqueous Organic Solvents*

Solvent	solvent content (%)	product (%)		
		Fua-Phe-Gly-NH ₂	Fua-Phe	Fua-Phe-OEt
dioxane	3.0	29.5	70.5	---
MeCN	15.0	63.0	37.0	---
DMF	7.0	9.3	90.7	---
DMSO	8.0	4.4	94.1	1.5

* [E] = 0.1 μ M, [Fua-Phe-OEt] = 2mM, [Gly-NH₂] = 0.1M, 0.2 M NaCl, pH 8.0 (0.1 M Hepes), 1 h, 30 °C.

Table 3 はFig. 1 におけるdioxane 3%での加水分解活性を基準にTable 2 と類似の合成反応をCPase Wで行った結果である。CPase Wにおいても CPase Yと同様に加水分解活性が同じ値であっても、合成収率はまったく違うことがわかる。また、CPase WをCPase Yと比較すると合成収率の高さはMeCN,dioxane,DMF,DMSO の順で、同じ傾向を示しているが、CPase Wは DMF やDMSOを加えた系では合成収率がかなり低い値を示した。

Table 2 やTable 3 において加水分解活性が同じ値であっても合成収率がまったく違い、合成収率は MeCN, dioxane, DMF, DMSO の順で、同じ傾向を示しているのは、両酵素において有機溶媒による基質と酵素の相互作用の変化、基質の求核性やイオン性の変化が、有機溶媒の種類に大きく依存するためであると考えられる。

有機溶媒の酵素反応に及ぼす効果には、

- 1) 酵素そのものの変化 --- 構造変化
- 2) 基質と酵素の相互作用の変化
- 3) 基質の変化 --- 求核性、イオン性
- 4) 反応中間体（経路）の変化 --- 溶媒和

などが考えられる。特に合成反応では、加水分解反応と比べて3)の要因が大きく働くとともに求核剤と酵素との相互作用（2の類）が更に問題となる。

もちろん、1)の因子についても有機溶媒の種類により大きな効果の差があるだろうが、加水分解活性の変化と合成活性の変化との差を中心にして考えると2,3)の因子の関与が大きいと思われる。

3. 3. 水と混じり合わない溶媒系における合成反応

Table 4 は異なる有機溶媒中での合成反応をみたものである。基質としてFua-Phe-OEt、求核剤としてPhe-NH₂を用い12hr反応させた結果である。酢酸エチルを溶媒として用いたときの合成収率を100とした相対収率で示してある。三種類の溶媒の中では酢酸エチルを用いたものが最もよい収率を与えた。

Table 4.

Relative Yield of "Immobilized" CPase Y Catalyzed Peptide
Synthesis in Different Organic Solvents.*

Solvent	Relative yield	Water solubility**
Ethyl Acetate	100	3.0
Benzene	15	0.07
Chloroform	5	0.7

* [Fua-Phe-OEt]= 1mM, [Phe-NH₂]= 50mM, 30 °C, 12h, pH 9.0

** Solubility of water into organic phase at 30°C (wt/wt%).

Table 5は"固定化"させる前の酵素溶液のpHの影響を調べたものである。生成物の収率が"固定化"時のpHに大きく依存していることがわかる。同じ基質を用いた系での合成反応を水と混じり合う有機溶媒(MeCN)を含む水系で調べたものでは至適pHが8.0付近であるのに対し、マイクロ二相系ではかなり高pH側に移っている。

Table 5.

pH Dependence of the "Immobilized" CPase Y Catalyzed Peptide Synthesis in Ethyl Acetate on "Immobilizing" Condition.

pH	product (%)		
	Fua-Phe-OEt	Fua-Phe-Phe-NH ₂	Fua-Phe
7.4	99.3	0.7	0.0
7.9	97.2	2.7	0.1
8.4	83.4	15.9	0.7
8.9	45.8	51.0	3.2

[Fua-Phe-OEt] = 1mM, [Phe-NH₂] = 0.1M, 30 °C, 24h

Table 6.

Enzyme to Glass-beads Ratio (E/GB) Dependence of Peptide Synthesis by "Immobilized" CPase Y in Ethyl Acetate.

E/GB×100	product (%)		
	Fua-Phe-OEt	Fua-Phe-Phe-NH ₂	Fua-Phe
2	23.8	73.0	3.2
1	67.2	32.2	0.6
0.5	78.7	20.9	0.4
0.25	89.6	10.4	---
0.1	98.1	1.9	---

[Fua-Phe-OEt] = 1mM, [Phe-NH₂] = 50mM, 30 °C, 24h, pH 9.0

Table 6 はTable 4 と同様な系による合成反応において、ガラスビーズに吸着させる酵素の量が合成収率に与える影響を示したものである。表中で示されるE/GB (wt/wt) はガラスビーズ100mgに対する酵素量を示している。測定した範囲内においては酵素量の増加に伴い合成収率も増加していくことが認められ、近似的にはこの範囲内で比例関係に近い。

またTable 7 は合成収率に対する求核剤濃度の影響を示したものである。水系での合成反応と同様に求核剤の濃度を上げることにより、合成収率が増加するという傾向がわかる。見かけの半飽和点は5mM 程度であると判断される。

Table 7.

Phe-NH₂ Concentration Dependence of Peptide Synthesis
by "Immobilized" CPase Y in Ethyl Acetate.

amide conc. (mM)	product (%)		
	Fua-Phe-OEt	Fua-Phe-Phe-NH ₂	Fua-Phe
10	18.8	53.3	27.9
20	17.4	63.9	18.7
40	18.4	69.2	12.4
80	19.7	71.0	9.3
100	19.5	71.9	8.6

[Fua-Phe-OEt] = 1mM, 30 °C, 24h, pH 9.0

このように、比較的有機溶媒耐性が低い CPase Y でも、ガラスビーズに"固定化"する方法により水と混じり合わない有機溶媒中でのマイクロ二相系において合成活性を示すことが確かめられた。予備的に実験した含水酵素粉末を直接有機溶媒中へ分散させる方法では合成活性がみられなかった結果と比べても、この方法の優位性が理解される。

Table 4 において、合成の至適pHが見かけ上高pHに移動したのは、溶媒として用いた酢酸エチルが微量の酢酸を含んでいる (約0.005%) ためマイクロに存在している水分中のpHが低くなっていることも考慮に入れるべきであろうが、このような環境下において水素イオンや酸の解離が通常とは大きく異なったものになっていることが主な原因と考えられる。

一般に非水溶媒の存在する系でのpH依存性などの考察においては、非水溶媒の

- 1) pH電極の応答性に及ぼす影響
- 2) 緩衝液のpKaに及ぼす影響
- 3) 酵素上の解離基のpKaに及ぼす影響

4)水のイオン積に及ぼす影響

5)水素イオンの活量そのものに及ぼす影響

など多くの因子を対象としなければならない。このうちここでの例では2)以下の項目が中心となるが、水よりも低い誘電率の溶媒を考えると、2,3,4)は同一のメカニズムで把らえることができる。



カルボン酸や水のようにプロトン解離によってイオン化が生じる場合には、生成した正負イオン間の静電引力が $1/D$ に比例して大きくなることと、それぞれのイオンの脱水和がイオン状態を不安定化させることから(溶媒の添加は)平衡を大きく左に偏らせることになる。



これに対しアミノ基とその共役酸との間の平衡のようにイオン数に変化がない場合には、溶媒の添加はあまり影響を与えないか、両イオンの水和に対する効果の違いにより若干平衡が右へ進むことが多い。このことは、ここで用いている緩衝液はすべていわゆるグッドバッファーでありアミノ、イミノ基が中心に働いていることを考えると、一定のpHに設定した後に有機溶媒と共存させると実質的にpHが若干下がってしまうことを意味している。また特にマイクロ二相系や、逆ミセル系のように比表面積の多い水滴中での水素イオンの活量が大きくなっていることが知られているが^{4, 5)}、これも見かけのpH依存性の違いに寄与していよう。

Table 8.

Effect of Molecular Sieve Addition on the "Immobilized"
CPase Y Catalyzed Peptide Synthesis in Ethyl Acetate.

M.S.* Wt. (mg)	product (%)		
	Fua-Phe-OEt	Fua-Phe-Phe-NH ₂	Fua-Phe
0	37.4	60.3	2.3
10	51.0	48.0	1.0
21	50.6	48.6	0.8
35	48.8	50.4	0.8
62	53.8	45.7	0.5

[Fua-Phe-OEt] = 1mM, [Phe-NH₂] = 50mM, 30°C, 24h, pH 9.0

* Weight of molecular sieves 3A 1/16 in 0.3 mL solution.

Table 7 において、求核剤の濃度が低い系ではFua-Phe-OEt の加水分解物であるFua-Phe がかなり多く生成している。これは酵素を吸着させる段階で、乾燥の度合いが不十分であったことが影響したと思われる。当然反応系に含まれる水分を脱水することで、加水分解物の生成は抑えることができる。しかし、酵素の構造維持や活性に必要な水分まで脱水を行うと活性が低下し、合成収率も減少すると考えられる。Table 8 は酢酸エチル中でのFua-Phe-Phe-NH₂ の合成反応系へ乾燥剤であるモレキュラシーブ (3A 1/16)を加えた結果である。反応系の最終含水量が決定できないが、少なくとも上記の考察を裏付けていると思われる。

一方、このような系では合成反応はかなりゆっくりと進行し、反応開始後およそ12hrで反応はほとんど進行しなくなる。24hr後では12hr後の収率よりわずか数%が増加する程度であった。これは時間の経過とともに、酵素に何らかの失活が起こっているものと思われる。さらに、反応を終了させたのちガラスビーズを回収して再び同じ反応を行い、繰り返し活性を測定した場合、ほとんど活性を示さなかったことから推定される。今後の課題としては、このような繰り返し安定性を高めるための検討が必要であると思われる。

4. まとめ

酵素タンパク質にとって極端な条件と考えられるものの中で、有機溶媒という因子についてセリンカルボキシペプチダーゼを用い加水分解反応やペプチド合成に対する影響を検討した。

CPase YとCPase Wのエステラーゼ活性に対して、反応系での水と混じり合う有機溶媒の増加は、 k_{cat}/K_m の値を低下させることが示された。またCPase Yについては有機溶媒の増加は、 K_m の値を増加させることが示された。

この結果に基づき CPase Yを用いたペプチド合成に対する水と混じり合う有機溶媒の影響が検討されたが、MeCNを加えた反応系において最も良い収率が得られた。また、CPase YとCPase Wの両酵素において、合成収率は有機溶媒の種類に大きく依存することがわかった。

CPase Y は比較的有機溶媒に対する耐性が低いと理解されていたが、反応系のほとんどを水と混じり合わない有機溶媒としたいいわゆるミクロ二相系においても十分な合成活性を示すことが明らかになった。

以上の研究は極限条件のうちのひとつについてしかもセリンカルボキシペプチダーゼという特定の酵素の挙動について報告したものであるが、種々の酵素を工業的により有効に利用しようという過程において有用な知見となると考えられる。

引用文献

- 1) 例えば、三浦謹一郎ら編、(1988) "タンパク質工学"、啓学出版。
- 2) Nakanishi, K., Kamikubo, T., and Matsuno, R. (1985) *Bio/Technology*, 3, 459-464.
- 3) Han, D. and Rhee, J.S. (1986) *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1250-1255.
- 4) Barbaric, S. and Luisi, P.L. (1981) *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 4239-4244;
Grandi, C., Smith, E., and Luisi, P.L. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 837-843.
- 5) Menger, F.M. and Yamada, K. (1979) *J. Am. Chem. Soc.*, 101, 6731-6734.
- 6) 稲田祐二編、(1987) "タンパク質ハイブリッド"、共立出版。
- 7) Applewhite, T.H., Martin, R.B., and Niemann, C. (1958) *J. Am. Chem. Soc.*, 80, 1457-1464.
- 8) Clement, M.L. and Bender, M.L. (1963) *Biochemistry*, 2, 836-843.
- 9) Tanizawa, K. and Bender, M.L. (1974) *J. Biol. Chem.*, 249, 2130-2134.
- 10) Hayashi, R., Moore, S., and Stein, W.H. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 2296-2302.
- 11) Umetsu, H., Abe, M., Sugawara, Y., and Nakai, T. (1981) *Food Chem.*, 7, 125-138;
Umetsu, H., Matsuoka, H., and Ichishima, E. (1983) *J. Agric. Food Chem.*, 48, 217-230.
- 12) Hayashi, R., Bai, Y., and Hata, T. (1975) *J. Biochem. (Tokyo)* 77, 69-79;
Bai, Y., Hayashi, R., and Hata, T. (1975) *J. Biochem. (Tokyo)* 77, 81-88;
Hayashi, R., Bai, Y., and Hata, T. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 5221-5226.
- 13) 森原和之 (1981) 蛋白質核酸酵素, 26, 1-20.
- 14) Widmer, F., Breddam, K., and Johansen, J.T. (1980) *Carlsberg Res. Commun.*, 45, 453-463;
Breddam, K., Widmer, F., and Johansen, J.T. (1983) *Carlsberg Res. Commun.*, 48, 231-237;
Breddam, K., Johansen, J.T., and Ottesen, M. (1984) *Carlsberg Res. Commun.*, 49, 457-462.
- 15) Fukuda, M., Shima, H., Tanabe, K., Ito, T., and Kunugi, S. (1987) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 60, 1403-1406.
- 16) Klivanov, A.M. (1986) *Chemtech*, 354-359;
Zaks, A. and Klivanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.*, 263, 3194-3201.
- 17) Fukuda, M. and Kunugi, S. (1984) *Eur. J. Biochem.*, 142, 565-570.
- 18) Fukuda, M. and Kunugi, S. (1985) *Eur. J. Biochem.*, 149, 657-662.
- 19) Reichardt, C. (1979) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 18, 98-110.